

N° d'Ordre
42

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Henri QUÉRÉ

Pharmacien-Chimiste de 1^{re} Classe de la Marine

Né le 10 février 1904 à Brest (Finistère)

1^{re} THÈSE. — Recherches sur la croissance et le métabolisme d'une bactérie acétique.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenue le 9 novembre 1935 devant la Commission d'Examen :

JURY :

Président : M. DAURE, Professeur

Examineurs : MM. GENEVOIS, Professeur
TRUCHET, Professeur.

BORDEAUX
IMPRIMERIE J. BIÈRE

18, rue du Peugue, 18

1935

N° d'Ordre
42

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Henri QUÉRÉ

Pharmacien-Chimiste de 1^{re} Classe de la Marine

Né le 10 février 1904 à Brest (Finistère)

1^{re} THÈSE. — Recherches sur la croissance et le métabolisme d'une bactérie acétique.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenue le 9 novembre 1935 devant la Commission d'Examen :

JURY :

Président : M. DAURE, Professeur

Examineurs : MM. GENEVOIS, Professeur

TRUCHET, Professeur.

BORDEAUX
IMPRIMERIE J. BIÈRE

18, rue du Peugue, 18

—
1935

UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTE DES SCIENCES

MM.

Doyen..... CHAINE, Anatomie comparée et Embryogénie.

Doyens honoraires.... { PADE, Recteur honoraire.
PICART, Astronomie.
DUPONT, professeur à la Faculté des Sciences
de Paris.

Professeurs honoraires.

BENARD
VIGOUROUX
SAUVAGEAU
BOUNHIOL

DEVAUX
RICHARD
DUPONT

Professeurs.

PICART	Astronomie.
GUINCHANT	Physique générale.
CHAINE	Anatomie comparée et Embryogénie.
TROUSSET	Mécanique rationnelle.
MERCIER	Physique expérimentale.
FEYTAUD	Zoologie et Physiologie animale.
DAGUIN.....	Géologie et Minéralogie.
DAURE	Physique.
DANGEARD.....	Botanique.
GENEVOIS	Physiologie végétale et Chimie biologique.
MILLOUX	Calcul infinitésimal et Analyse supérieure.
TRUCHET.....	Chimie organique.
N.....	Chimie minérale et Chimie physique.

Chargé du service d'une chaire

Maître de conférences honoraire

Maîtres de conférences.....

Maître de conférences adjoint

Secrétaire

QUELET.

MANVILLE.

AVEL, Zoologie.

BRUS, Chimie.

CHOUARD, Botanique.

ARRIVAUT.

ARTIGUELONG.



A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

*Bien faible témoignage de
profonde reconnaissance.*

A MES CHEFS

A MES ANCIENS MAITRES

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GENEVOIS

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

*Vous avez inspiré ce travail
et permis, dans des circon-
stances personnelles difficiles,
sa réalisation. Je vous exprime
ici l'hommage de ma vive gra-
titude.*

INTRODUCTION

Cette étude a été entreprise en 1930, à une époque où trois groupes de chercheurs s'occupaient des bactéries acétiques : l'école de Wieland, qui voyait dans la fermentation acétique une déshydrogénation, celle de Neuberg, qui avait découvert la dismutation de l'aldéhyde en alcool et acide, celle de Tamiya et Shibata, qui avait repris les idées et les expériences de Wieland. Il a paru au contraire que cette oxydation de l'alcool en acide acétique était une forme de respiration, respiration par oxydation, avec activation de l'oxygène réagissant. En 1931, l'expérience me montrait qu'un ferment acétique typique était incapable d'attaquer les sucres, en aérobiose ou anaérobiose, et qu'il oxydait régulièrement et rapidement la fonction alcool primaire. La soi-disant « fermentation acétique » doit être considérée comme la respiration de la bactérie acétique, respiration conduisant à des oxydations plus ou moins complètes selon les conditions expérimentales, mais présentant tous les caractères d'une respiration. Ces résultats ont été publiés en 1931; en 1933, O. Warburg, reprenant cette conception, montrait l'existence d'un ferment respiratoire typique chez les Bactéries acétiques, ferment visible optiquement à côté du cytochrome, et repérable par voie photochimique. La notion de fermentation acétique considérée comme un type bien caractérisé de respiration par oxydation directe tend donc aujourd'hui à devenir classique.

L'étude faite en 1931, de la bactérie isolée à Bordeaux, avait montré qu'elle était rigoureusement dépourvue d'action sur les sucres, soit qu'il s'agisse d'oxydation ou qu'il s'agisse

de fermentation anaérobie. Ce résultat ayant paru surprenant au Professeur Neuberg, une souche de la bactérie de Bordeaux lui fut envoyée; il put confirmer entièrement les résultats acquis, la bactérie possède cependant des traces de carboxylase, de méthylglyoxalase, d'aldéhydomutase (Neuberg et Simon 1932).

Les principaux faits établis à Bordeaux concernant le métabolisme des bactéries acétiques ayant été confirmés par des techniques expérimentales que les moyens modestes d'un laboratoire de province ne permettaient pas d'acquérir, l'étude de cette bactérie a été dirigée vers une autre voie: l'étude de sa croissance et des inhibiteurs de la croissance. Un grand nombre de substances ont été passées en revue, d'où il résulte que la croissance de la bactérie est inhibée bien avant sa respiration; les inhibiteurs les plus actifs sont des substances liposolubles, qui portent des groupes électro-négatifs (diphénols, brome); un groupement chimique, le groupement isosulfocyanate, semble spécifiquement actif; son activité dépasse d'une puissance de 10 au moins celle déjà élevée des autres composés liposolubles. Une généralisation à d'autres bactéries a été tentée; le bacille tuberculeux est également très sensible aux isosulfocyanates. Il y a là l'amorce de travaux ultérieurs.

CHAPITRE PREMIER

- I. *Introduction.*
Historique de la fermentation acétique.
- II. *Systématique des bactéries acétiques.*
 - a) Classification de Janke.
 - b) Classification de G. Bertrand.
- III. *Le bacterium Bordeaux.*
 - 1. Isolement-dénomination.
 - 2. Caractères microscopiques
 - 1° Normaux.
 - 2° Influence du milieu.
 - 3. Milieux de cultures
 - a) Solides.
 - ô) Liquides.
 - 1° Naturels.
 - 2° Artificiels.
 - 4. Conditions de développement.

I. INTRODUCTION

Historique de la fermentation acétique.

On avait observé depuis longtemps, que surtout aux saisons chaudes, tous les liquides alcooliques devenaient acides à la longue et que le contact de l'air était indispensable à cette transformation. Lavoisier précisa même l'action particulière de l'oxygène dans cette fermentation acéteuse. Ce fut Doeberëiner qui montra, à la suite d'une expérience de Liebig, que l'oxygène transformait l'alcool en donnant de l'eau et de l'acide acétique.

Berzélius, lui, admettait que l'acétification ne pouvait avoir lieu qu'en présence d'un « ferment » inclus dans la substance mucilagineuse contenue dans la mère du vinaigre, mais il pensait qu'il était nécessaire, pour qu'elle puisse agir, qu'elle contienne dans ses pores de l'acide acétique. Et

Berzélius entendait par ferments acétiques des substances comme le pain aigri, la levure, les matières extractives du vin et surtout l'acide acétique. Macquer, dans son *Dictionnaire de chimie* semblait partager l'opinion de Berzélius d'autant plus que les méthodes employées dans la fabrication du vinaigre à Orléans au moyen de la « matière visqueuse » du fond des tonneaux semblaient leur donner raison.

Chaptal remarquait bientôt que la mère donne un meilleur rendement en vinaigre lorsqu'il y a de la fleur à sa surface. A ce moment, c'est-à-dire vers 1835, Cagniard de la Tour découvrait le phénomène du bourgeonnement des cellules de levure. Turpin et Kutzinig émirent alors l'hypothèse que cette matière visqueuse était bien le ferment acétique et Dumas songeait bien à une action fermentaire mais se refusait, tant qu'on n'aurait pas isolé les ferments de toute autre substance et qu'on n'aurait pas étudié leurs actions propres, à admettre *a priori* leur existence.

La question était difficile à résoudre étant donné qu'à ce moment même, Davy et Doebereiner réussissaient à obtenir de l'acide acétique au moyen de l'alcool et du noir de platine par voie purement chimique.

Liebig, lui, attribuait aux matières organiques en général et aux matières azotées surtout, un rôle prépondérant dans l'acidification de l'alcool, et, à son sens, cette transformation était « absolument du même ordre que l'action qui provoquait la formation d'acide sulfurique dans les chambres de plomb ». Il y voyait uniquement une action catalytique.

Telles étaient les théories sur le phénomène au moment où Pasteur publia en février 1862 ses premiers mémoires sur la question. A cette époque, il réussit à isoler des organismes qu'il ensemença sur des liquides marquant 10° environ à l'alcoomètre centésimal : cette « plante cryptogamique » se développant en surface, amena la transformation immédiate et complète de l'alcool en acide acétique. Et il observa que lorsque cette plante est en pleine activité, dans les meilleures conditions de vie, elle produit beaucoup moins d'acide

acétique : elle détruit même cet acide. Si, au contraire, on lui diminue ses matériaux nutritifs de choix, à ce moment alors elle transforme l'alcool en aldéhyde et en acide acétique.

Cette découverte de Pasteur détruisait l'hypothèse de l'action identique des corps poreux admise jusque-là. Ainsi les copeaux de hêtre, dans le procédé industriel bien connu, agissaient non plus en tant que corps poreux tels que le noir de platine, mais bien comme supports du *mycoderma aceti*. Pasteur montrait en même temps que la matière cellulosique à laquelle Terreil attribuait l'acétification n'était autre chose que la mère du vinaigre qu'il trouva particulièrement riche en cellulose.

Pasteur, continuant ses recherches, montrait bientôt que pour agir, il était nécessaire que la fleur du vinaigre fût en surface et ne reconnaissait aux mères déposées au fond des tonneaux aucune action acétifiante. « Tout se passe, disait-il, à la surface du liquide. »

II. SYSTEMATIQUE DES BACTERIES ACETIQUES

Les ferments acétiques décrits jusqu'à ce jour sont extrêmement nombreux. Au point de vue de leur classification systématique, Henneberg en distinguait quatre groupes d'après le milieu où ils se développaient. Lafar séparait des autres le *Bacterium xylinum* qu'il rangeait dans le groupe des ferments acétiques visqueux (Schleimessig-Bakterien).

Janke proposait de les classer selon leurs propriétés physiologiques et selon la façon dont ils évoluaient dans le milieu de Beijerinck avec sels ammoniacaux et acide acétique comme sources de carbone, et il distinguait les ferments haplotrophes à développement normal dans ces conditions et les ferments symplotrophes qui comprennent les autres types. Dans les premiers il rangeait le groupe Schutzenbach ne donnant aucune pellicule visqueuse et le groupe Hansenianum qui donnait des membranes. Dans les seconds, le groupe Rancens avec *Bacterium aceti*. (Hansen) non mobile, *B. aceti* (Brown)

mobile, *B. albuminosum* Lindner dans la bière, le groupe *Pasteurianum*, le groupe *xylinum* qui formait des zooglées.

G. Bertrand et Sazerac avaient proposé de classer les bactéries de la fermentation acétique en deux catégories : les bactéries cétogènes et les bactéries non cétogènes. Cette classification reprise par S. Hermann et P. Neuschull permet de grouper dans la première catégorie : *B. xylinum*, *B. xylinoides*, *B. gluconium* et dans la deuxième : *B. Pasteurianum*, *B. Kutzingienum*, *B. Rancens*, *B. ascendens* (Henneberg), *B. vini acetati*, *B. acetosum*, *B. aceti*.

A quelque groupe qu'elles appartiennent toutes ces bactéries ont pour propriété générale d'oxyder les alcools éthylique et propylique et presque toutes, sauf *B. ascendens*, oxydent le glucose en acide gluconique.

III. LE BACTERIUM BORDEAUX

§ 1. *Isolement. — Dénomination.*

Nous avons réussi à isoler une souche de ferments acétiques du voile recouvrant la surface libre d'un ballon Fernbach contenant du vin rouge de Bordeaux titrant 9°,ensemencé naturellement depuis un temps assez long (plusieurs années). Le ballon de Fernbach servait à une production régulière de vinaigre; tous les 15 jours, un demi-litre environ de vinaigre était prélevé, soit la moitié environ du liquide qu'il contenait; ce vinaigre était remplacé par la même quantité d'un bon vin naturel. Il a été assez difficile d'isoler cette bactérie acétique à l'état de pureté : pour obtenir une culture pure et florissante, il nous a fallu faire une vingtaine de passages sur gélose solide au vin blanc neutralisé par NaOH N/10 à pH 4,5 à 5, la bactérie ne s'étant habituée que difficilement à ce milieu synthétique. Mais lorsque l'accoutumance a été réalisée, la culture se conservait parfaitement bien de 45 à 50 jours sans avoir besoin d'être repiquée et, lors des ensemencements sur des milieux liquides, les cultures qui donnaient les meilleurs résultats dataient de 15-20 jours. Il suffisait pour conserver la

souche en activité, de la repiquer seulement tous les deux mois environ.

La bactérie ne semble s'identifier à aucune variété déjà décrite; nous verrons plus loin qu'elle a, entre autres caractères biochimiques, celui de ne point attaquer les hexoses; cette propriété ayant paru remarquable au Professeur Neuberg, une souche lui fut envoyée en 1932; le fait fut reconnu exact par Neuberg et Simon et republié par eux la même année; dans ce mémoire la bactérie fut désignée sous le nom de « *Bacterium Bordeaux* ».

Pour ne point créer de confusion, nous avons adopté la dénomination du Professeur Neuberg, sans préjuger du rattachement de cette bactérie à un groupe déjà connu. D'après les indications précédentes notre bactérie se rapprocherait du *Bacterium Pasteurianum* et du *Bacterium ascendens*.

§ 2. Caractères microscopiques.

Au point de vue morphologique, cette bactérie présente les caractères suivants : bâtonnets de 3-4 μ de long sur 1 μ environ d'épaisseur en moyenne, avec çà et là quelques formes plus courtes. Ces bâtonnets sont en petits amas ou isolés, avec des extrémités légèrement arrondies. Pas de capsules. Pas de spores.

La coloration par la méthode de Gram est positive. Ces organismes sont très peu mobiles. Ils se développent assez rapidement sur ce milieu gélosé, à la température du laboratoire. En 18 heures les colonies commencent à être visibles et sont complètement développées au bout de trois jours.

Cette bactérie, au point de vue de sa place dans la classification de Janke semble devoir se ranger dans le groupe *Pasteurianum* et dans celle de G. Bertrand, dans le groupe des ferments non cétoènes. Une description abrégée de cette bactérie, faite par le professeur Henneberg, est donnée dans le mémoire de Neuberg et Simon de 1932.

§ 3. *Milieux de culture.*

α) *Milieux solides.*

En ce qui concerne les milieux propres au développement, nous avons observé sur gélose inclinée pure des traînées de colonies punctiformes, incolores, humides, de même qu'en gélose Veillon. La gélose au sous-acétate de plomb ne se trouve pas noircie.

Sur pomme de terre il se forme des cultures maigres, transparentes mais humides et luisantes.

6) *Milieux liquides.*

Sur bouillon peptoné on obtient un trouble uniforme, important et par agitation des ondes moirées, et on observe au fond du ballon un léger dépôt filamenteux aisément dissociable; aucun voile en surface. Mêmes résultats en bouillon ascite et bouillon glucosé.

En eau peptonée, culture assez abondante, avec trouble homogène et léger dépôt.

Sur gélatine, des colonies punctiformes, blanchâtres, le long de la piqure.

Sur le lait, aucune coagulation nette mais seulement quelques grumeaux déposés au fond du tube. Le lait tournesolé se coagule en une sorte de bouillie se déposant au fond du tube et on observe un léger virage du milieu.

Sur sérum coagulé, une culture maigre, sèche, en traînée. Sur bile, aucune modification du milieu.

Brown arrivait à cultiver facilement *Bacterium xylinum* sur vin rouge dilué à moitié et additionné de 1% d'acide acétique. De même, il est possible, en partant de cultures en traînées sur gélose inclinée au vin blanc non soufré, neutralisé, stérilisé à 105°, pendant 15 minutes, d'obtenir des cultures étendues en ensemençant la souche au moyen d'une anse de platine à la surface de vin blanc ordinaire neutralisé à moitié en présence de carbonate de chaux et stérilisé à 110° pendant 10 minutes.

Il y a intérêt, la bactérie étant avide d'oxygène, d'employer des récipients à large surface, type Fernbach. Ainsi,

en partant de cultures pures, on obtient une production régulière d'un voile bactérien au bout de quatre jours et le liquide sous-jacent reste limpide. Il est recommandé aussi de ne pas agiter les récipients à cause du carbonate de Ca qui est au fond, bien séparé du voile par une épaisseur de liquide de 1,5 à 2 cm. environ.

Le développement de ce voile grêle à la surface du vin blanc ne se fait pas extemporanément. Il semble que la première génération de cellules mette un certain temps (18 à 36 heures environ) pour s'adapter au nouveau milieu et ce n'est qu'au bout de ce temps qu'on voit en 24 heures le voile s'étendre progressivement et recouvrir bientôt toute la surface libre en remontant même sur les bords des Fermbach.

Si nous examinons, quelques jours après le développement complet du voile, c'est-à-dire une dizaine de jours après l'ensemencement, les organismes qui se constituent, nous constatons que la morphologie des cellules a changé. On trouve alors des bâtonnets beaucoup plus allongés prenant l'aspect de filaments mycéliens, sur lesquels apparaissent par places, mais de façon inconstante et irrégulière, des renflements ovoïdes. Peut-être avons-nous là des spores, des formes de résistance? Si nous portons les cellules du voile en plein développement dans un milieu neutre ou très peu acide, le même phénomène se produit. Il semble qu'il y ait là une nette influence de la réaction du milieu car les mêmes filaments reportés sur leur milieu électif reprennent à la longue leur forme primitive de bâtonnets plus courts.

De même, si nous laissons le voile sur un milieu complètement acétifié, la même transformation se produit; nous avons probablement affaire à des formes de dégénérescence et elles sont à rapprocher des « formes d'aberration » ou *Abweichungsformen* de Hansen dues à une sorte d'intoxication de la bactérie par les produits mêmes de son activité physiologique. Et dans ce cas, l'acide acétique paraît avoir un rôle prépondérant car de telles formes se produisent surtout lorsqu'on augmente l'acidité du milieu.

La croissance, au bout d'un certain temps, s'arrête probablement à cause de l'épuisement des matières nutritives d'une part et à cause des produits élaborés par la fermentation d'autre part. En effet, si on ensemence le milieu dont l'alcool a été épuisé par une première fermentation, au moyen de bactéries neuves, il ne se produit aucun développement et il suffit d'y ajouter de l'alcool en proportions convenables pour que le voile se forme au bout de quelques jours, mais plus lentement qu'en l'absence des produits de la première fermentation.

Nous avons essayé de cultiver cette bactérie sur divers autres milieux synthétiques alcooliques seuls, puis alcooliques et minéraux. Sur les premiers nous n'avons rien obtenu. G. Bertrand après Brown et Pasteur, utilisait une solution peptonée avec phosphates alcalins, sel marin, sulfate de Mg. Janke obtenait de bons résultats avec le milieu suivant :

Phosphate bipotassique	0 gr. 4
Phosphate monoammonique ..	1 gr.
Sulfate de magnésium	0 gr. 4
Glycérine	1 gr.
Acide succinique	1 gr.
Eau distillée	1.000 gr.

L'acide succinique servait à faire disparaître le précipité qui se formait. Il ajoutait de l'alcool dans la proportion de 30 gr. par litre lors des expériences et attribuait un rôle essentiel aux sels d'ammonium dans ce mélange. Wustenfeld conseillait l'emploi de l'acétate comme sel d'ammonium et Klocker, grâce à ce milieu, put conserver au Laboratoire de Carlsberg des ferments acétiques vivants pendant 5 ans.

Pour la culture de notre bactérie, nous avons utilisé aussi la solution suivante :

Sulfate de magnésium, sol. à 50 °/100	} à 80 cc.
Phosphate biacide de K, sol. à 30 °/100	
— monoacide de Na, sol à 10 °/100	
Sulfate d'ammonium à 50 °/100	

Eau de levure autolysée	200 cc.
Alcool à 95°	100 cc.
Eau robinet qsp	1000 cc.

qui nous a donné des résultats cependant moins constants que le vin blanc neutralisé à pH 5.

Aucun résultat sur eau de levure seule. De même sur bière ni sur moût de bière.

Sur vin rouge, le développement est possible à condition toutefois que l'acidité exprimée en acide acétique ne dépasse pas 24 gr. ‰ .

Sur le milieu suivant les bactéries poussent, mais de façon irrégulière et beaucoup plus lente que sur vin :

Sulfate d'ammonium	} ââ 30 gr.
Phosphate biacide de K	
Phosphate bisodique	

Phosphate bipotassique.....	} ââ 20 gr.
Sulfate de Mg.....	

Asparagine.....	1 gr.
Carbonate de Ca.	50 gr. en suspension
Alcool à 95°.....	80 cc.
Eau robinet qsp	1.000 cc.

Les cultures, même les plus vivaces, ne résistent pas à un séjour à la glacière, même de quelques heures et il est impossible d'obtenir des colonies appréciables à une température inférieure à 16°. Les conditions optima de température sont réalisées à l'étuve de 25-28°; au delà de 35° on n'obtient plus rien.

Les milieux à ensemercer doivent être soigneusement stérilisés à cause du développement facile et très rapide des anguillules à leur surface. On a prouvé que dès 60° ces organismes aérobies sont détruits à la stérilisation.

La lumière inhibe la formation d'acide acétique et cette action semble due aux rayons ultra-violetts qui agissent dans ce sens encore mieux en présence d'oxygène.

Rosenblatt et Mordkowitsch ont montré l'influence active sur la croissance des sels de Ni et de Co qu'ils trouvent plus actifs, contrairement à l'opinion de G. Bertrand et Sazerac, que les sels de manganèse et de fer.

§ 4. Conditions de développement.

Lorsqu'on effectue des ensemencements à des températures et dans des conditions identiques, du ferment acétique sur une série de récipients semblables contenant la même quantité du même milieu de culture, on constate en prenant l'acidité des solutions au bout du même temps, qu'on arrive à des chiffres voisins mais présentant entre eux quelques différences. Les écarts observés, assez faibles cependant, sont d'autant plus grands que la fermentation est plus avancée et ceci jusqu'à un certain stade. Ils sont peu importants au début, et à la fin ils diminuent aussi.

Ces écarts augmentent si l'ensemencement est fait légèrement, c'est-à-dire si le ferment se développe lentement et les irrégularités sont encore plus nettes lorsqu'on cherche à entraver la fermentation par une même dose d'antiseptiques. Cela tient probablement à une résistance variable des différentes cellules d'une même souche vis-à-vis des toxiques, du moins au début de leur développement.

Les ferments acétiques se développent le mieux lorsque les concentrations en alcool sont comprises entre 5 et 11% en volume, mais aucune race ne pousse au delà de 15%.

De plus la limite supérieure de l'acidité en acide acétique supportée varie suivant la souche mais jamais aucune bactérie n'a pu supporter plus de 14% (comme l'ont montré Steinmetz et Bokorny).

Voici d'ailleurs les chiffres :

Bactérie acétique	% acide acétique supporté
B. oxydans	2
B. acetigenum	2, 7
B. Pasteurianum	6, 2

B. acetosum	6, 6
B. aceti	6, 6
B. Kutzingianum	6, 6
B. Schutzenbachii	10, 9
B. Bordeaux	6, 4

Le tableau suivant permet de comparer B. Bordeaux aux bactéries acétiques non céto-gènes connues.

L'examen de ce tableau montre que B. Bordeaux semble se rapprocher de *B. ascendens* mais nous verrons par la suite qu'il s'en différencie assez nettement par d'autres propriétés.

TABLEAU I

MORPHOLOGIE ET BIOLOGIE DES FERMENTS ACETIQUES

Nom de la bactérie	Pellicule	Ascendance sur les parois			Viscosité	Trouble du liquide	Formes géantes	Mobilité	Tempér.		Milieu principal	Conc. max	
									opt.	max.		Alcool	Ac. acétique.
B. acéti	assez épais	—	++	—	—	+	—	—	34	42	bière	11	6,6
B. acétosum				—	—	+	—	—	28	36	bière haute	11	6,6
B. Pasteurianum	nette	—	—	—	—	très peu	—	—	34	42	»	9,6	6,2
B. Kutzingianum	mince	++	+	++	—	rare	—	—	34	42	»	9,5	6,6
B. rancens	sèche plissée	+	—	—	—	+	—	—			»	»	»
B. ascendens	homogène	++	—	++	—	très peu	—	—	31	44	vin	12	9
B. vini acetati	très mince	+	—	+	—	—	—	—	28-33	36	»	»	»
B. Bordeaux	nette	+	—	—	—	rare	—	—	27-30	40	vin	10	6,4

CHAPITRE II

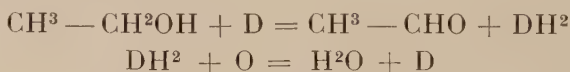
METABOLISME DES BACTERIES ACETIQUES

- I. Mécanisme de l'oxydation de l'alcool par les ferments acétiques.
- II. Energétique des réactions.
- III. Etude expérimentale de la respiration de B. Bordeaux.
- IV. B. Bordeaux en anaérobiose.

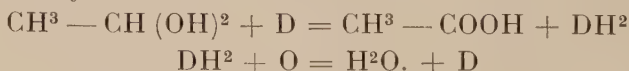
I. MECANISME DE LA FERMENTATION ACETIQUE.

Trois mécanismes ont été invoqués pour expliquer l'oxydation de l'alcool en acide acétique par ces bactéries :

1° Une déshydrase arrache de l'hydrogène à l'alcool pour en faire de l'aldéhyde acétique; cette déshydrase réduite serait autooxydable.



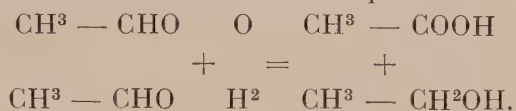
L'aldéhyde acétique hydratée subirait à son tour l'action de la déshydrase :



Cette conception a été défendue par Wieland dès 1913 et par son élève Bertho en 1928. Il faut valoir qu'un accepteur d'hydrogène tout différent de l'oxygène, la quinone, permet la formation d'acide acétique en anaérobiose aux dépens de la réduction de la quinone en hydroquinone. Nous verrons plus loin que la quinone fonctionne comme peroxyde et se substitue réellement à l'oxygène actif du ferment res-

piratoire; les accepteurs d'hydrogène incapables de former un peroxyde (thionine, bleu de méthylène) ne peuvent remplacer la quinone ni l'oxygène libre.

2° L'aldéhyde formée subirait une réaction de Cannizzaro, une dismutation en alcool et acide acétique :



Ce phénomène a été mis en évidence par Neuberg et Windisch en 1925; il existe indiscutablement. Neuberg et Nord en 1919 avaient pu montrer la formation massive d'acétaldéhyde, au cours de la fermentation acétique aérobie par fixation au moyen de sulfite de chaux; en anaérobiose, il se produit incontestablement une transformation de l'aldéhyde en alcool et en acide au contact des bactéries; malheureusement, cette transformation se fait avec une grande lenteur par rapport à l'oxydation normale de l'alcool; c'est pourquoi Bertho et Basu dénie à la dismutation tout rôle notable dans l'oxydation normale de l'alcool en acide acétique.

TABEAU II

VITESSE DE REDUCTION DE LA QUINONE, DE L'OXYGENE ET DU BLEU DE METHYLENE POUR UNE MEME BACTERIE (*B. Orléanense*)

(D'après Bertho)

Substances	Concentrations (millimolécules par litre)	Millimolécules réduites par heure
Quinone	160	45
	80	42
	40	40
Bleu de Méthylène	2	1,3
Oxygène.....	Oxygène pur	45
	Air	40

Simon en 1930, montra que la dismutation augmente d'importance au fur et à mesure que la réaction du milieu se rapproche de la neutralité.

Le tableau 3 montre que la vitesse d'oxydation de l'alcool est de 25 à 130 fois plus grande que la vitesse de dismutation chez trois espèces de bactéries acétiques; ce rapport varie d'ailleurs beaucoup d'une expérience à une autre pour une même bactérie.

TABLEAU III

RAPPORT DES VITESSES D'OXYDATION AEROBIE ET DE DISMUTATION ANAEROBIE DE L'ALDEHYDE ETHYLIQUE CHEZ DIVERSES BACTERIES

(D'après Bertho et Basu, 1931).

Organisme	Température	D Dismutation de l'aldéhyde en anaérobiose	D' Oxydation aérobie de l'aldéhyde		D' D
		Acide acétique formé en millimolécules	O ² con- sommé (en milli- molécules)	Acide acétique formé (en milli- molécules)	
Bact. Orléan.	28°8	2,65	4,30	111	42
	28°6	4,0	4,37	112	28
Bact. Past.	28°2	1,05	3,30	83	83
Bact. Arc.	29°4	0,83	4,16	107	133
—	28°0	2,05	1,90	50	25

En 1930, Simon put établir la distinction biochimique très nette entre l'oxydation de l'alcool en aldéhyde et acide acétique, et la dismutation de l'aldéhyde au contraire en alcool et acide acétique :

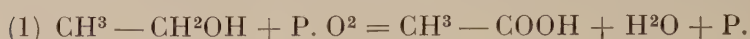
1° L'oxydation par O^2 gazeux de l'alcool ou de l'aldéhyde se produit avec des vitesses du même ordre, quel que soit le pH du milieu, de 3 à 7; elle subsiste avec une vitesse notable dans les bactéries âgées. Par contre, elle disparaît dans les préparations acétoniques de bactéries.

2° L'oxydoréduction de l'acétaldéhyde en alcool et acide, attribuée à une « mutase », va très lentement en milieu acide, au-dessous de pH 6; elle n'acquiert une vitesse importante qu'au-dessus de pH 6,5; l'effet de « mutase » disparaît dans les bactéries âgées; au contraire de l'effet d'oxydation, la « mutase », subsiste encore avec une activité presque normale, dans les bactéries traitées à l'acétone.

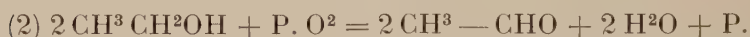
3° Dans une note publiée en juillet 1931, nous considérons la formation d'acide acétique comme l'effet de la respiration de la bactérie, *Bactérium Bordeaux* oxyde régulièrement et spécifiquement les fonctions alcool en acide; la vitesse, l'inhibition par le cyanure de potassium rapprochent ce phénomène de la respiration. Warburg et Christian reprirent en 1933 cette conception de la fermentation acétique considérée comme une forme de la respiration cellulaire; grâce à un puissant outillage qui n'existe malheureusement pas en France, ils montrèrent dans *Bacterium Pasteurianum*, bactérie voisine de celle que nous avons étudiée, l'existence d'un ferment respiratoire typique, caractérisé par le spectre d'inhibition de l'oxydation en présence d'oxyde de carbone, et par le spectre d'absorption visible au spectroscopie. C'est sur une bactérie acétique que fut rendu visible pour la première fois le ferment respiratoire typique, dont l'existence était jusque-là seulement déduite de mesures photochimiques.

Les bactéries acétiques possèdent à la fois du cytochrome, au moins les cytochromes B et C, et du ferment respiratoire dont les bandes d'absorption sont très nettement différentes; le cytochrome joue le rôle de réservoir d'hydrogène, il se réduit facilement mais n'est pas autooxydable et ne sert pas de transporteur d'hydrogène; il ne se combine pas non plus à l'oxygène : il est indifférent à ce corps de même qu'à l'oxyde de carbone et au cyanure de potassium.

Le ferment respiratoire se combine au contraire à l'oxygène et à l'oxyde de carbone et cela d'une façon réversible; l'action de la lumière dissocie la combinaison oxycarbonée du ferment respiratoire, réaction qui permet d'étudier photochimiquement son spectre. De plus le ferment respiratoire a la propriété de former avec l'oxygène un peroxyde, dont l'oxygène est actif et réagit sur le substrat de la respiration, ici l'alcool :



L'alcool se présente également en molécules associées; on observe aussi la réaction :



Les rapports des deux réactions (1) et (2) peuvent être absolument quelconques ainsi que les expériences de Bertho et de Janke (1935) l'ont montré.

Dans cette conception, l'alcool est réellement oxydé par un oxydant biologique; il ne cède pas de l'hydrogène à un accepteur, mais il brûle son hydrogène. Cette conception s'appuie sur les arguments expérimentaux suivants :

1° Le cyanure de potassium à très faible dose inhibe la fermentation acétique.

2° L'oxyde de carbone agit de même, l'inhibition étant fonction du rapport $\frac{\text{CO}}{\text{O}^2}$

3° Les bactéries possèdent un ferment respiratoire typique dont le spectre coïncide avec celui du ferment des levures et de la rétine du rat albinos.

Ces notions paraissent aujourd'hui d'une parfaite clarté. Mais au moment où nos recherches ont commencé, rien des travaux de Warburg n'était publié; les deux conceptions qui faisaient alors l'objet des discussions étaient : la conception de la déshydrogénation de Wieland et celle de la dismutation de Neuberg.

L'une et l'autre de ces deux conceptions nous parurent insuffisantes pour expliquer le mécanisme de la fermentation acétique; il nous sembla plus simple d'admettre que

cette « fermentation » était purement et simplement la respiration de la bactérie, opinion que nous émettions en 1931. Nous allons donner les arguments expérimentaux qui nous conduisirent à cette hypothèse.

II. ENERGETIQUE DES REACTIONS

Avant de passer à l'étude expérimentale des bactéries, il importe de se rendre compte de la signification des phénomènes envisagés au point de vue énergétique.

Voici les chaleurs de combustion des molécules étudiées en milieu aqueux étendu, les produits de combustion étant supposés dissous :

Alcool éthylique.....	325,2	cal.
Aldéhyde acétique	274,8	—
Hydrogène.....	69,0	—
Aldéhyde acétique + H ²	344,0	—
Différence avec l'alcool	18,8	—

La chaleur de combustion du système aldéhyde + hydrogène surpasse de 18,8 calories celle de l'alcool; cette réaction de déshydrogénation, endothermique, ne se produira que si H² s'engage dans une réaction de réduction dégageant plus de 18,8 calories.

Trois réactions de réduction ont été étudiées par les expérimentateurs :

1° Réduction de l'oxygène en eau



2° Réduction de la quinone en hydroquinone



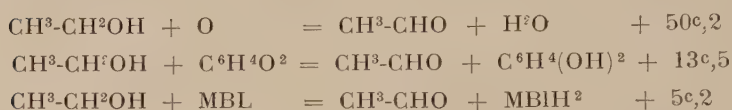
3° Réduction du bleu de méthylène en leucodérivé.



Les chaleurs de réduction dépendent des conditions de milieu (acidité, concentration) en sorte que les chiffres donnés ne représentent qu'un ordre de grandeur.

Les prévisions thermodynamiques doivent en principe être déduites du calcul de l'énergie libre et non des seules chaleurs de réactions; le calcul de ces énergies libres étant difficile et incertain, nous nous contenterons des chaleurs de réaction, en spécifiant qu'il ne s'agit que d'une première et très grossière approximation.

Ces réserves faites on prévoit *a priori* la possibilité d'oxyder l'alcool en aldéhyde, puisque chacune de ces trois réactions dégage plus de 19 calories; les réactions seront :



Les colorants dont le potentiel d'oxydoréduction est tel que $\text{rH}^2 < 11$, dégagent en se combinant à l'hydrogène moins de 18,8 calories, et ne doivent pas être réduits en présence d'alcool et d'une bactérie acétique. C'est ce que M^{lle} Cozic a vérifié avec *Bacterium xylinum* en 1933. Le Bleu de Nil et les colorants de potentiel inférieur ne sont pas réduits par *Bacterium xylinum* en anaérobiose, ni par les bactéries acétiques non cétogènes, ainsi qu'il a été vérifié au Laboratoire de Bordeaux.

Mais ces considérations thermodynamiques sont absolument insuffisantes pour expliquer les phénomènes observés. Bertho et ses collaborateurs ont constaté que les bactéries acétiques réduisent aussi rapidement ou plus rapidement les molécules de quinone en hydroquinone, qu'elles ne réduisent les molécules d'oxygène en eau; au contraire, les molécules de bleu de méthylène sont réduites 12 fois plus lentement que les molécules d'oxygène; dans les expériences de M^{lle} Cozic, les divers colorants étaient réduits en anaérobiose 50 fois plus lentement que l'oxygène. Il en résulte évidemment que les deux phénomènes, d'une part l'oxydation de l'alcool aux dépens d'un peroxyde (quinone) ou aux dépens de l'oxygène activé par la cellule bactérienne, qui forme précisément à son intérieur un peroxyde (ferment respiratoire), et d'autre part déshydrogénation de l'alcool aux dépens d'un accepteur d'hydrogène incapable de former

un peroxyde sont deux phénomènes différents qui coexistent dans la bactérie mais qui ne se confondent pas. *Bacterium Pasteurianum* contient, d'après Warburg et Negelein (1933), une quantité de ferment respiratoire supérieure à celle de la plupart des autres cellules (levures, cellules animales), ce qui explique une intensité respiratoire 10 à 100 fois supérieure à celle des autres cellules. *Bacterium Pasteurianum* contient également, d'après Warburg et Christian, une petite quantité de flavine, qui est le ferment catalysant les déshydrogénations; cette petite quantité de flavine peut expliquer les déshydrogénations observées en anaérobiose, conduisant à la réduction de matières colorantes de rH approprié.

L'analyse expérimentale des faits permet de distinguer aisément entre les deux phénomènes :

1° L'oxydation par l'oxygène libre est inhibée par KCN en solution millinormale et par CO; elle n'est pas augmentée par la présence de bleu de méthylène.

2° Lorsque quinone et oxygène libre sont simultanément en présence la quinone est d'abord réduite et les cellules ne consomment pratiquement pas d'oxygène libre; lorsque toute la quinone est réduite les cellules se remettent à consommer O² avec la même vitesse que les témoins (Wieland et Bertho 1928). Les deux phénomènes se remplacent, la quinone est concurrente de l'oxygène. Quoique la réduction de la quinone dégage seulement 13,5 cal. aux dépens de la formation de l'aldéhyde acétique, tandis que la formation d'eau par l'oxygène en dégage 50, c'est la réduction de la quinone qui se produit seule d'abord et plus vite que la combustion de l'oxygène en eau. L'énergie dégagée dans une réaction biologique n'est pas le facteur qui règle la réaction.

3° La réduction de la quinone n'est pas inhibée par KCN N/1000 puisque ce corps empêche la formation d'un peroxyde par le ferment respiratoire; la cellule en présence de quinone est en présence d'un « peroxyde » tout préparé en quelque

sorte. La réduction de la quinone, toujours pour la même raison, n'est pas inhibée par CO.

La réduction du bleu de méthylène en anaérobiose se comporte tout différemment.

1° Elle n'est pas ralentie par KCN N/1000 et l'est très peu par les concentrations de CO qui inhibent la respiration.

2° Elle est catalysée par la lumière, alors que la respiration ne varie pas sous son influence (en l'absence de CO) (Tamiya, Hida et Tanaka, 1930),

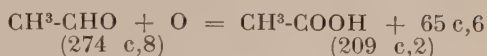
Bertho admettait néanmoins encore en 1932 que la réduction du bleu de méthylène, de la quinone, et de l'oxygène était un seul et même phénomène; il donne pour explication de la réduction très lente du bleu de méthylène, de la thionine, le fait que ces colorants ne pénètrent pas dans la cellule bactérienne; ce fait est exact, malheureusement rien ne démontre que la quinone y pénètre davantage. Si la fonction des bactéries acétiques était réellement d'activer l'hydrogène de l'alcool, on ne voit pas du tout pourquoi cette fonction existerait encore vis-à-vis de la quinone et disparaîtrait dans la proportion de 92 à 98 % vis-à-vis des accepteurs d'hydrogène les plus typiques.

Les levures réduisent également le bleu de méthylène cent fois plus lentement qu'elles ne consomment de l'oxygène; or, les levures se colorent vitalement par le bleu de méthylène. La respiration des levures est due à leur ferment respiratoire, dont le spectre d'absorption et les propriétés chimiques coïncident avec ceux des bactéries acétiques; elle n'a rien à voir avec la réduction du bleu de méthylène, réduction catalysée par la flavine, mais non par le ferment respiratoire rouge.

Dans tout ce qui précède, le raisonnement a été conduit comme si la respiration de la bactérie consistait essentiellement en un passage de l'alcool à l'aldéhyde. Une partie de l'aldéhyde est oxydée en acide acétique; cette partie est d'ailleurs parfois faible.

Cette oxydation peut se faire de deux manières :

1° Par fixation directe d'oxygène :



Les mesures se font sur 2 cm³ de la suspension en laissant les robinets des manomètres ouverts un moment pour réaliser l'équilibre de température. On lit sur les manomètres à des intervalles de temps régulièrement espacés, mais variables suivant l'intensité respiratoire, la quantité d'O² consommé que nous ramenons au nombre de mm³ d'O² à 0°C et 760 mm. de Hg est rapportée au milligramme et à l'heure. Cette quantité est désignée par I₀₂. Nos expériences ont montré que le nombre de mm³ par cm³ de suspension et par heure variait entre 170 et 180.

Il a fallu, pour le calcul, prendre le poids du contenu dans 1 cc. Pour cela, nous avons pris 200 cc. de suspension bactérienne que nous avons centrifugée : les culots réunis ont été séchés sur papier buvard et portés sur verre de montre taré à l'étuve à 105°. Au bout de 2 heures, plusieurs pesées successives nous ont donné un poids sec à peu près constant de 0 gr. 070. En même temps, nous avons sur une même prise, fixé au formol et décanté 2 mois après, séché de même façon, ce qui nous donne un poids de 0,071, une autre prise de 300 cc. nous donna 0,112, soit donc une moyenne de 0 mg. 36 par cm³ qui conduit à une valeur de I₀₂ pour les bactéries étudiées voisine de 470.

TABLEAU IV
RESPIRATION DE B. BORDEAUX

Temps	Témoin Récipient 3	Récipient 6	Récipient 2
10 h. 25	— 1	— 43	— 40
35	— 1	— 36	— 42
45	0	— 39	— 49
		— 255	— 260
55	— 2	— 42	— 46
11 h. 05	0	— 47	— 48
15	— 1	— 49	— 45
		cc = 1,24 255 → 330	cc = 1,28 260 → 332
mm ³ O ² cc. cult.		165	166
Intensité respiratoire I ₀₂		471	474

Les cultures conservées à la glacière présentent une diminution de l'intensité respiratoire très nette et cela très rapidement. Voici les résultats typiques d'une série d'expériences :

TABLEAU V
INFLUENCE DE LA CONSERVATION A LA GLACIERE
SUR L'INTENSITE RESPIRATOIRE

Date		O ² cc. hepre	I ₀ 2
10 janvier	Culture normale	— 165	471
11 —	24 h. à la glacière	— 70	200
12 —	48 h. —	— 55	157
13 —	72 h. —	— 10	28

Donc, au bout de 3 jours, les bactéries ont perdu une vitalité qui décroissait proportionnellement au temps passé à la glacière.

En mettant NaOH (0 cc3), dans le récipient central, on peut mesurer le CO² dégagé et absorbé.

TABLEAU VI
QUOTIENT RESPIRATOIRE DE B. BORDEAUX

	O ² consommé cc /suspension	CO ² produit	$\frac{CO^2}{O^2}$
1 ^{re} expérience	— 530	— 83	0,156
2 ^e —	— 151	— 24	0,16
3 ^e —	— 98	— 16	0,163

Le quotient respiratoire de ces bactéries est donc voisin de 0,16.

Si au lieu de reprendre le culot de centrifugation par du vin neutralisé, nous faisons vivre les bactéries dans un milieu essentiellement minéral (un mélange de $\text{PO}^4\text{K}^2\text{H}$ et PO^4NaH^2 et que nous mesurons l'intensité respiratoire dans ces conditions, nous trouvons qu'elle est pratiquement nulle. Le résultat ne change pas si on ajoute au milieu minéral du glucose : la consommation en oxygène des bactéries est généralement négligeable.

Il n'en est plus de même si nous fournissons comme aliment des alcools. Si on ajoute ces composés, la consommation en O^2 devient énorme et atteint un ordre de grandeur de 1 cm^3 d' O^2 consommé par milligramme sec de bactéries et par heure à 28° ($\text{I}_0^2 = 1.000$).

En comparant les divers alcools éthylique, propylique, isobutyrique et isoamylique, on trouve des absorptions d'oxygène grossièrement en raison inverse du poids moléculaire de l'alcool considéré.

Voici deux expériences où l'on a mesuré les millimètres cubes d' O^2 consommé par centimètre cube de suspension bactérienne et par heure à 28° .

TABLEAU VII
INFLUENCE DE DIVERS ALCOOLS
SUR LA RESPIRATION DE B. BORDEAUX

Alcools	Poids moléculaire	Age des cultures	
		7 jours $\text{mm}^3 \text{O}^2$ consommé	8 jours
Ethylique	46	692	557
Propylique	60	619	464
Isobutylique	74	468	432
Isoamylique	88	333	308

La propriété caractéristique de ces bactéries est donc d'oxyder la fonction alcool par un mécanisme analogue

au mécanisme de la respiration : cette réaction est la réaction productrice d'énergie de ces bactéries.

L'alcool méthylique est, lui aussi, brûlé par les ferments acétiques alors que l'acide formique est oxydé avec une intensité beaucoup plus faible. Sur l'aldéhyde formique aucune action, sauf lorsque les solutions sont très diluées (de l'ordre de 1 ‰); dès que la concentration atteint 3 ‰, on n'observe plus aucun dégagement de CO².

Les alcools supérieurs, glycol, glycérol, éthylglycol introduits dans l'ampoule latérale de l'appareil de Warburg et versés au bout d'un certain temps dans une suspension de bactéries bien vivantes respirant sur milieu au vin, non seulement n'augmentent pas l'intensité respiratoire, mais encore avec certains d'entre eux comme le glycol et l'éthylglycol, l'I₀² est légèrement diminué. M^{lle} Cozic a trouvé au contraire que le glycérol était un aliment très favorable à la respiration de *B. xylinum*, ainsi d'ailleurs que sa mono-acétine. Pour la diacétine et la triacétine, les I₀² étaient légèrement inférieurs.

IV. ATTAQUE ANAEROBIE DES SUCRES PAR LES BACTERIES ACETIQUES

La fermentation alcoolique des sucres par la zymase est due à tout un arsenal de ferments : apozymase, cozymase, carboxylase, mutase; des réactions secondaires, comme la formation d'acétylméthylcarbinol, sont dues à des ferments spéciaux (carboligase). Dès 1925, Neuberg et Windisch découvrirent dans les bactéries acétiques une carboxylase assez active, et une mutase; P. Mayer (1926), G. Gorr et G. Perlmann mirent en évidence une cétonaldéhydmutase. T. Kitasato (1928) montra l'existence de carboligase, et de phosphatase. Myrback, von Euler et Sandberg (1928) décelèrent une très petite quantité de cozymase. C. Neuberg et E. Simon en 1928 obtinrent avec *B. ascendens* et *B. Pasteurianum* une véritable ferment-

tation alcoolique. Il faut pour la mettre en évidence des quantités énormes de bactéries : la quantité de bactéries correspondant à 15 g. de poids sec, était répartie dans 1,200 cc³ de solution; 1,25 de bactéries (comptées sèches) agissait sur 1,2 g. de glucose, le tout dans 100 cc³ de bouillon de levure, apportant un grand excès de cozymase. Dans ces conditions, on obtenait en 24 heures la destruction du quart ou de la moitié du sucre introduit; au bout de ce laps de temps, la fermentation se ralentissait beaucoup, pour s'arrêter complètement au bout de 48 heures. Sans cozymase du bouillon de levure, la quantité de sucre transformée en 24 heures était de l'ordre de 20 à 30 % de la quantité introduite, c'est-à-dire de l'ordre du quart du poids sec des bactéries agissant. Si l'on songe que les levures typiques détruisent par fermentation, dans les mêmes conditions de concentration et de température, leur poids sec de sucre par heure, c'est-à-dire 24 fois leur poids en 24 heures, on en déduira que la fermentation alcoolique des deux bactéries étudiées a une intensité environ cent fois plus faible que la fermentation des cellules de levure; l'addition de bouillon de levure, double et triple la vitesse de fermentation des cellules de levure, comme il double fréquemment la vitesse de fermentation des bactéries acétiques, en sorte que les proportions restent les mêmes.

Les proportions d'alcool et d'acide carbonique de la fermentation alcoolique des bactéries acétiques, dosées par Simon en 1928, ne correspondent pas exactement, en général, aux proportions de la fermentation selon Gay-Lussac; il y a généralement plus de CO² dégagé que d'alcool formé, ce qui prouve l'existence de réactions secondaires de décarboxylation.

En 1930, Simon réétudia la formation d'alcool en anaérobiose, aux dépens du glucose, par *Acetobacter suboxydans* et *B. Pasteurianum*; les rendements sont toujours très faibles, 5,4 g. de bactéries (poids sec) agissant pendant 21 heures sur 4 gr. de glucose, produisent 0,5 g. d'alcool.

La vitesse de fermentation du sucre est ici encore de l'ordre de 1 pour 100 du poids sec de la bactérie par heure. Ces mêmes bactéries oxydent 1 à 2 fois leur poids d'alcool par heure en aérobiose. Le métabolisme aérobie des bactéries acétiques étudiées est donc environ 200 fois plus intense que le métabolisme de fermentation alcoolique. Pour les levures hautes, au contraire, les deux métabolismes sont du même ordre. Dans ce même mémoire de 1930, Simon mit en évidence, chez ces bactéries, l'existence de carboxylase, cétonaldéhydmutase, glycolase, phosphatase et aldéhydmutase.

En 1931, nous avons entrepris sur le B. Bordeaux, la recherche de la fermentation alcoolique anaérobie.

Les expériences, en anaérobiose, ont été conduites au moyen de l'appareil manométrique de Warburg. Autour du godet central se trouvait la suspension bactérienne soit : 2 cc correspondant à un poids d'environ 50 mgr., contenant le sucre à 1 % environ.

Pour obtenir une anaérobiose convenable nous avons remplacé l'air du récipient par un mélange de gaz carbonique et d'azote, dans la proportion de 95 volumes de celui-là pour 5 volumes de celui-ci.

En aucune circonstance nous n'avons, au tube manométrique, pu constater de dénivellation supérieure à 10 mm³ bien que nous ayons prolongé les expériences pendant 6 et même 10 heures quelquefois.

Malgré l'emploi de grandes quantités de nos bactéries, et la sensibilité des méthodes manométriques, nous n'avons pu mettre en évidence une fermentation alcoolique, même égale au centième de celle des levures. Ce résultat, qui n'avait d'ailleurs rien d'étrange, attira l'attention de Neuberg et Simon, en 1932, qui eurent l'obligeance de répéter l'expérience, et la confirmèrent sur une souche de bactéries envoyées de Bordeaux. Plusieurs milieux de culture furent essayés, afin de donner autant que possible à la bactérie l'occasion

de manifester l'existence de tous ses ferments; ni sur moût de bière, ni sur moût de bière alcoolisé, ni sur bouillon de viande au moût de bière, que l'on soit en milieu liquide ou sur agar, la bactérie ne développe de zymase. Même portée en bouillon de levure (cozymase) glucosé, la bactérie est incapable de faire de l'alcool; ce n'est donc pas le manque de cozymase qui empêche la fermentation.

Par contre, Neuberg et Simon mirent en évidence dans ces bactéries, la carboxylase, la cétonaldéhydmutase, la glycolase, l'aldéhydmutase. Il faut d'ailleurs des doses tout à fait massives de bactéries pour mettre ces ferments en évidence : pour décomposer la moitié de 1,5 cm³ d'une solution normale d'acide pyruvique, en milieu tamponné à pH 5 environ, il faut 3 g. frais de bactéries, soit 0,6 g. sec environ, et il faut attendre 16 heures; la bactérie détruit à peine 1 % de son poids sec par heure d'acide pyruvique, alors que les levures détruisent plusieurs fois leur poids sec par heure d'acide pyruvique.

Cependant les bactéries desséchées attaquent l'acide pyruvique avec la même vitesse que les bactéries fraîches; la carboxylase résiste à peu près intégralement à la dessiccation.

La cétonaldéhydmutase existe à l'état de traces encore plus minimales; en effet, il a fallu une masse de bactéries correspondant à 14 g. sec pour transformer en 20 heures environ, 1 g. de méthylglyoxal, en présence de CO³ Ca, dans 500 cm³ d'eau, en acide lactique, avec un rendement en lactate de zinc de 75 % environ. Les tissus animaux transforment à peu près le quart de leur poids sec de méthylglyoxal en acide lactique par heure.

Les préparations acétoniques ou à l'alcool éther du B. Bordeaux, attaquent également l'hexose-diphosphate de Mg, pour donner du méthylglyoxal, d'où l'on peut conclure à la présence de glycolase. Les préparations acétoniques transforment quantitativement l'acétaldéhyde, en présence de CO³ Ca en alcool éthylique et acide acétique; mais il faut

faire agir 4 g. de préparation acétonique sur deux décigrammes d'aldéhyde, à 37°, en 24 heures, pour obtenir la dismutation.

Si intéressants que soient les faits si habilement mis en évidence par Neuberg et Simon, tels qu'ils se présentent ils ne permettent pas de conclusion bien générale; ils montrent qu'il y a dans ces bactéries un résidu, une trace de certains des ferments existant dans la levure ou la cellule animale à une dose cent ou mille fois supérieure. Le ferment respiratoire existe au contraire chez les bactéries acétiques à une concentration dix à cent fois supérieure à celle des cellules animales ou végétales; dans le cas de B Bordeaux étudié ici, les intensités respiratoires vont de 500 à 1.000, alors que chez les levures hautes, ces intensités vont de 20 à 50, et chez les cellules animales de 1 à 10.

CHAPITRE III

A. Inhibition de la croissance du B. Bordeaux.

I. Action de quelques composés chimiques sur la croissance du B. Bordeaux.

- a) Alcools et dérivés.
- b) Acides organiques monohalogénés et leurs esters.
- c) Cétones et aldéhydes halogénés.
- d) Résorcinol et dérivés.
- e) Quinosol .
- f) KCN et BrCN.
- g) Salicylate Na.
- h) Isosulfocyanates.
- i) Thiosinamine.
- j) Bromure d'allyle.
- k) Acide borique.

II. Généralisation à d'autres bactéries.

B. Inhibition de la respiration.

A) INHIBITION DE LA CROISSANCE DE B. BORDEAUX

I. Action de quelques composés chimiques sur la croissance de B. Bordeaux.

L'étude de l'action de certains agents physiques et chimiques sur la fermentation acétique a été commencée depuis longtemps. En 1915 Buck montrait que les rayons ultra-violets tuaient les ferments acétiques. Carles utilisait l'azotate d'argent à 0,01 par litre pour arrêter leur multiplication et Riegel, en Allemagne, se servait du brome dont il enlevait l'excès par l'hyposulfite de Ca., Wustenfeld étudiait l'action de l'hypochlorite de Ca. D'autre part, Frouin et Grégoire, en 1917, prouvèrent que l'étain tout en ne gênant pas le développement des microorganismes ralentissait, cependant, l'acétification.

Le fluorure de NH_4 et le formol étaient employés, autrefois, pour la conservation des vins et Siefert montra, d'une part, que les ferments acétiques supportaient des doses de fluorure beaucoup plus considérables que les levures et, d'autre part, que ceux-là étaient beaucoup plus sensibles que les mycodermes au formol : en effet, il observa que 1 / 100.000 de formol retardait leur développement pendant 15 jours et que la dose de 5 / 100.000 l'empêchait totalement.

La méthode d'étude, toujours la même, que nous avons utilisée pour ce travail a été la suivante : dans des ballons de 200 cm^3 environ, tous identiques, nous avons versé 25 cc. du milieu de culture type du B. Bordeaux contenant acide acétique et acétate à pH 4,7. Nous avons ajouté en opérant sur plusieurs ballons pour la même dose, des quantités croissantes des substances étudiées et ensemencé tous les récipients de la même quantité d'émulsion aussi homogène que possible, d'une culture de bactéries en pleine activité. Les ballons ont été placés ensuite à l'étuve à 28°C et les acidités dosées à intervalles réguliers de 24 ou 48 heures. Il était, d'ailleurs, au bout de 4 à 5 jours, très facile d'apercevoir macroscopiquement, par l'absence ou la présence d'un voile bactérien superficiel la concentration limite qui permettait le développement.

Nous avons étudié l'action de divers composés, de constitutions chimiques bien différentes.

a) *Alcools et dérivés.*

1° Pour le glycol, le méthylglycol et l'éthylglycol, nous avons observé qu'on est obligé pour constater une inhibition de la croissance, d'arriver à des concentrations voisines de celles de l'alcool éthylique, soit N/10 environ.

2° Avec les acétates de méthylglycol et d'éthylglycol, les concentrations limites sont de l'ordre de N/20.

3° Avec la monochlorhydrine du glycol, il faut arriver à N/25 et avec la monoformine du même alcool à N/30.

Donc, pratiquement, ni les alcools ci-dessus, ni leurs acétates, ni leur monochlorhydrine, ni leur monoformine, n'ont

d'action sur la croissance et leur action est tout à fait comparable à celle de C^2H^5OH .

b) *Acides organiques monohalogénés et leurs esters.*

1° Les acides monohalogénés.

L. Genevois et ses collaborateurs, Cayrol et Mlle Nicolaieff, ont étudié l'action des acides acétiques monohalogénés et de leurs esters sur les cellules de levure et sur les ferments lactiques. Ils ont montré qu'on pouvait faire croître des levures en présence de doses d'acide monobromacétique suffisantes pour arrêter toute fermentation, réussissant à inhiber ainsi d'une façon spécifique une fonction de la cellule vivante. Genevois a, d'autre part, prouvé qu'il était possible de conserver du lait à 26° pendant 48 heures, en lui ajoutant de l'acide bromacétique à la concentration de N/2'000, donc inférieure à la dose toxique pour l'organisme, dose qui est voisine de N/500.

Mlle Cozic, travaillant en 1933 sur *B. xylinum*, trouve, que pour empêcher le développement de ce microorganisme, il fallait une concentration de N/4.000.

Opérant sur B. Bordeaux, nous sommes arrivés, pour un même résultat, aux doses suivantes :

Pour acide monobromacétique	N/400
— acide monochloracétique	N/100
— acide monoiodacétique	N/200

Donc l'acide bromé est plus actif que l'acide iodé lui-même plus actif que l'acide chloré. Tous trois ont d'ailleurs une action assez faible sur la croissance :

Concentration en ABr empêchant la croissance.

Ferments lactiques	N/2.000
<i>Bacterium xylinum</i>	N/4.000
— Bordeaux	N/400

Alors que *B. xylinum* ne supporte que N/4.000, B. Bordeaux exige une concentration pratiquement 10 fois plus forte pour voir sa croissance inhibée.

2° Les esters.

Bromacétiques et chloracétiques. — Nous avons étudié ceux correspondant aux alcools méthylique, éthylique, propylique normal, octylique, au glycol, à l'éthylglycol, au glycérol pour la série grasse, à l'alcool benzylique et phénéthylique pour la série aromatique. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Bromacétate de méthyle	N /2.000
— d'éthyle.....	N /2.000
— de propyle	N /2.000
— d'octyle.....	N /3.000
— de glycol	N /2.000
— d'éthylglycol	N /3.000
— de glycérol.....	N /2.500
 Bromacétate de benzyle	 N /2.000
— de phénéthyle	N /2.000
 Chloracétate de méthyle	
— d'éthyle.....	N /200
— de propyle	N /200
— d'octyle.....	
— de glycol	N /500
— d'éthylglycol	N /800
— de glycérol.....	
 Chloracétate de benzyle	 N /500
— de phénéthyle	N /800

Nous n'avons pas étudié les dérivés iodacétiques.

La teneur de ce tableau montre que pour chacun des groupes de composés l'action semble indépendante de l'alcool qui estérifie la fonction acide et que l'activité dépend uniquement de l'halogène substitué, les ocmposés bromés étant grossièrement dix fois plus actifs que les composés chlorés. Elle paraît pouvoir être rapportée au groupement fonctionnel $\text{CH}^2\text{X} - \text{COO}$, le radical R estérifiant cette fonction acide ne jouant

qu'un rôle secondaire. De plus il est à remarquer que l'action inhibitrice des esters en général et plus particulièrement des bromacétates est beaucoup plus nette que celle de l'acide organique correspondant.

c) *Cétones et aldéhydes halogénés.*

Nous avons étudié en 1932 l'action de l'aldéhyde : α) bromo-moénanthylique $\text{CH}^3 - (\text{CH}^2)^4 - \text{CHBr} - \text{CHO}$, ou bromo-enanthol, très liposoluble, et celle de l'aldéhyde; β) bromo-propionique qui nous avaient été obligeamment préparés par M. Kirmann. Nous les avons trouvés doués d'une grande toxicité : le premier de ces corps, en effet, arrêta la croissance à N/50.000 alors que son dérivé bisulfite n'agissait qu'à N/10.000. Pour le deuxième on arrivait seulement à N/2.000.

Peu après, à Berlin, Simon étudiait l'action de l'aldéhyde iodacétique sur la fermentation alcoolique et réussissait à l'inhiber pour une concentration de N/1.000. En mars 1933, Genevois et Kirmann généralisaient le phénomène en montrant que les aldéhydes bromés ou iodés en α arrêtaient cette fermentation à N/1.000, phénomène qui était indépendant du poids moléculaire de l'aldéhyde.

On peut en conclure que la substitution en α fournit dans ce groupe de composés des corps beaucoup plus actifs que la substitution en δ , l'activité semblant indépendante du radical R de l'aldéhyde de formule générale $\text{R} - \text{CHX} - \text{CHO}$.

La bromacétone $\text{CH}^3\text{Br} - \text{CO} - \text{CH}^3$ agit à N/4.000.

d) *Résorcinol et dérivés.*

Ces composés présentent un grand intérêt parce qu'ils allient une puissance bactéricide remarquable à une faible toxicité pour l'organisme. Laubenheimer, Rettger et Hampil portèrent leurs travaux sur les substitutions nucléaires. La question se posa de savoir si la substitution dans le noyau est absolument indispensable à l'action germicide.

Dans les dérivés phénoliques, la présence du groupe OH

libre est essentielle dans l'effet antiseptique de ces composés. Dans les corps étudiés, le radical est rattaché au noyau au moyen d'un atome d'O et il reste un OH libre.

Jusqu'en 1929 on n'avait utilisé que certains éthers de la pyrocatechine dans des buts thérapeutiques et on avait cherché à réduire sa toxicité pour l'organisme humain par des substitutions dans les groupes OH. Klarmann et Shternov ont réussi à préparer les dérivés alkylés normaux, saturés jusqu'au nonyléther, ainsi que plusieurs éthers aromatiques.

Les résultats obtenus au point de vue bactéricide sont résumés dans le tableau suivant, les microbes employés ayant été, d'une part, le Bac. typhique, d'autre part, le Staph. doré. Sont notés, en plus des concentrations bactéricides en 5,10 et 15', les coefficients phénols, c'est-à-dire la comparaison de leurs actions avec le phénol dans les mêmes circonstances. Les expériences ont été faites à 37° C.

TABLEAU VIII

		B. typhique				Staphylocoque doré			
		5'	10'	15'	Coef. phéno I	5'	10'	15'	Coef. phénol
Ethers de la série grasse	Résorcinol	1/50	1/60	1/60	0,4	1/30	1/35	1/35	0,4
	Ether méthyl.....	1/160	1/180	1/200	1,3	1/80	1/90	1/90	1,2
	éthyl.	1/450	1/550	1/650	3,6	1/100	1/250	1/250	3
	— n.-propyl.	1/1000	1/1200	1/1200	6,9	1/400	1/400	1/500	5,4
	— n.-butyl.	1/2750	1/3000	1/3250	20	1/1300	1/1400	1/1500	18
	— n.-amyl.	1/6000	1/6000	1/6500	38	1/2750	1/2750	1/3000	36
	— isoamyl.	1/3750	1/3750	1/9000	26	1/2000	1/2000	1/2250	31
	— hexyl.	1/6000	1/7000	1/7000	46	1/7500	1/8500	1/1900	125
	— cyclohexyl..	1/2500	1/2750	1/2750	18	1/1500	1/1600	1/1600	20
	— n.-heptyl. ...	1/3000	1/3250	1/3500	21	1/25000	1/25000	1/25000	220
	— n.-octyl.	1/325	1/375	1/375	2,3	1/40000	1/45000	1/50000	580
	— n.-nonyl.	1/500	1/550	1/600	3,4	1/50000	1/50000	1/55000	650
	Phénol	1/130	1/140	1/160	1	1/70	1/80	1/80	1
Ethers aromatiques	Ether phényl.	1/4500	1/6000	1/6500	40	1/2500	1/2750	1/3000	37
	— benzyl.	1/2750	1/3250	1/3250	21	1/1100	1/1300	1/1300	16
	— phénéthyl. ...	1/4500	1/5000	1/5000	35	1/2250	1/2750	1/2750	39
	— phénylpropyl	1/5500	1/5500	1/5500	34	1/5500	1/7000	1/7000	89
	— p. cl. benzyl..	1/8000	1/8500	1/9000	61	1/2750	1/3000	1/3000	38
	Phénol	1/130	1/140	1/140	1	1/70	1/80	1/80	1

Donc pratiquement le résorcinol n'est pas bactéricide, pour ces deux organismes, alors que certains de ses monoéthers le sont à un très haut degré. Il est curieux de remarquer la relation différente qui existe pour les deux microbes entre le coefficient phénol et le poids moléculaire de la chaîne latérale, du moins en ce qui concerne les éthers de la série grasse. Alors qu'avec le bacille typhique l'action augmente d'abord avec le poids moléculaire pour atteindre un maximum avec l'éther hexyl, avec le St. doré, l'action va croissant sans cesse et le nonyléther se trouve être le plus actif et le pouvoir germicide apparaît ici comme une fonction directe de la longueur de la chaîne.

De plus, il résulte des travaux récents de Gatyas que l'introduction de radicaux iso semble conduire à des produits dont la puissance est inférieure à celle des dérivés à chaîne droite.

Les monoéthers du résorcinol obtenus par introduction de groupes aromatiques non substitués sont aussi des germicides puissants.

Alors que le phényl éther semble être un peu plus bactéricide pour le St. doré le pouvoir microbicide tombe dans le cas du benzyl éther, atteignant ensuite un nouveau maximum pour le B. typhique avec le phényléthyléther.

Pour le Staphylocoque, le phénylpropyléther est plus bactéricide que le composé précédent. Le point du maximum d'effet n'a pas été déterminé.

Les propriétés toxiques des composés du résorcinol avec des substitutions grasses ou aromatiques sont pratiquement les mêmes si les radicaux sont substitués dans le noyau en position ortho ou para aux 2 hydroxyles, ou s'ils sont simplement attachés à l'un des atomes d'O, c'est-à-dire que les deux corps suivants agissent de même façon.



Si on substitue un halogène dans le noyau, par exemple si l'on prépare le para-chlorobenzyl éther, l'action bactéricide est cependant considérablement renforcée.

Nous avons étudié l'action du résorcinol et du dérivé l'hexylrésorcinol sur la croissance de nos bactéries acétiques et constaté que le résorcinol a une action à peu près nulle sur elle. Il faut, en effet, arriver à une concentration voisine de N/50 pour observer une inhibition.

Voici le schéma d'une expérience faite à ce sujet, les chiffres représentent le nombre de cm³ de NaOH N/10 nécessaires pour saturer l'acidité de 2 cc. du milieuensemencé.

TABLEAU IX

Concentration en résorcinol		Cc. de NaOH N/10 neutralisant 2 cc. vin			
		Début	7 ^e jour	9 ^e jour	11 ^e jour
1	N/200	1,8	8,6	10,2	14,7
2	N/200	»	5,9	6,4	8,6
3	N/50	»	4,7	5,8	7,2
4	N/25	»	2,2	2,2	2,2
5	N/10	»	2,1	2,2	2,2

Aucun développement visible macroscopiquement en 4 et 5, alors que 1 et 2 étaient au septième jour recouverts d'un beau voile bactérien.

Avec l'hexylrésorcinol, nous sommes arrivés à des concentrations de l'ordre de N/5.000, soit encore environ cent fois plus élevée qu'avec le résorcinol.

Il est probable que l'action beaucoup plus nette de l'hexylrésorcinol tient à ce que ce produit est très liposoluble et cette

propriété permet peut-être aussi d'expliquer l'activité plus considérable des esters halogénés par rapport à celle des acides organiques correspondants. Il est curieux de constater que les rapports d'activité sont les mêmes dans les deux cas avec des corps de constitutions chimiques pourtant bien différentes.

On a cherché par des substitutions à renforcer l'action germicide du résorcinol. L'introduction de groupements aromatiques dans le noyau du résorcinol et en particulier des groupements benzyl, phénéthyl et phénylpropyl conduit à des composés dont le pouvoir bactéricide est très augmenté. Cette action est nette surtout dans le cas du groupe phénéthyl.

D'autre part, la substitution d'halogènes dans ces mêmes composés produit encore le même effet. Cette action germicide augmente avec le nombre d'atomes d'halogènes introduit alors que la toxicité du produit diminue d'abord pour s'élever ensuite. Une molécule de pentabromophénol a exactement la même action que 500 molécules de phénol et un phénol monohalogéné est moins toxique que le phénol ordinaire, alors que la toxicité du phénol trihalogéné égale approximativement celle du phénol lui-même et que celles du phénol tetra et penta halogéné sont supérieures à celles du phénol.

Klarman et Wower ont constaté l'action inactivante des produits antiseptiques employés en présence de matière organique et surtout de matières protéiques.

Bechhold et Ehrlich avaient déjà remarqué que l'action germicide très prononcée des phénols polyhalogénés substitués est considérablement diminuée en présence de sérum, une telle réduction d'activité n'étant pas obligatoirement accompagnée d'une précipitation des protéines. L'inactivation par la matière organique des phénols ou crésols non substitués a lieu aussi mais à un degré moindre.

Parallèlement, nous avons observé une diminution d'activité assez nette dans l'action de l'hexylrésorcinol sur la croissance du bacille tuberculeux en présence de sérum à

37°. Cette action est d'ailleurs variable avec la nature de la matière protéique et le degré d'hydrolyse qu'elle peut subir dans le milieu.

Il est probable que la diminution de l'action désinfectante des phénols, polyphénols et de leurs dérivés est liée à la fixation du ou des groupements hydroxyle par un groupement de la molécule protéique (NH^2 , COOH , OH , $\text{NH}\dots$) et nous trouvons peut-être dans ce phénomène de l'inactivation l'explication de l'action antiseptique propre de certaines protéines; elles contiendraient des groupements identiques à ceux qui permettent la fixation du désinfectant sur le corps microbien.

e) *Quinosol (ou Chinosol).*

Ce composé ou sulfate neutre d'orthoxyquinoléine qui est considéré comme un antiseptique puissant, ni toxique, ni caustique, arrêtant le développement des microbes, s'est trouvé n'agir qu'à la concentration de N/800. Ce composé est en effet très peu liposoluble et il est en particulier insoluble dans l'éther.

TABLEAU X

	Cc. NaOH N°10 pour neutraliser l'acidité de 2 cc. milieu culture		
	Début	6 ^e jour	10 ^e jour
Témoin	2,5	10,1	14,7
Quinosol N/200	»	2,7	4,4
— N/400	»	2,8	5,0
— N/800	»	2,9	5,3
— N/1000	»	4,6	14,8
— N/2000	»	14,9	19,2

f) *Dérivés du cyanogène.*

Nous avons étudié le bromure de cyanogène qui inhibe la croissance à la concentration de N/10.000, puis le cyanure de potassium, poison spécifique de la respiration qui arrête complètement le développement à N/60.000.

g) *Salicylate de Na.*

Cet antiseptique avait été étudié par Garoféanu dans le traitement de quelques états infectieux, surtout dus au colibacille. Il avait observé que le coli ne poussait plus sur gélose/salicylate en présence d'une dose de ce sel comprise entre 0,15 et 0,20 par litre, soit N/600 environ. Essayé sur B. Bordeaux, ce sel s'est trouvé empêcher la croissance à une concentration voisine de N/3000, soit 0,05 ‰ environ.

Si l'on recueille les microorganismes des flacons où la croissance a été inhibée et qu'on les lave pour enlever l'antiseptique, on constate que réensemencés sur milieu normal, ils ne se développent plus, ce qui prouve bien l'action microbicide de ce composé.

h) *Isosulfocyanates.*

Nous avons étudié les deux composés suivants : isosulfocyanates d'allyle ou essence de moutarde ou allylsènevol $\text{CH}^2 = \text{CH} - \text{CH}^2 - \text{N} = \text{C} = \text{S}$ et de phényle $\text{C}^6\text{H}^5 - \text{N} = \text{C} = \text{S}$. Le premier de ces corps, antiseptique connu depuis longtemps, empêche la croissance à la dose de N/50.000 alors que l'isosulfocyanate de phényle n'agit qu'à N/20.000, B. *xylinum* est bien plus sensible à l'isosulfocyanate de phényle (N/10.000) qu'à celui d'allyle (N/2.000 seulement). L'allylsènevol, très volatil, est pourvu par le groupement sulfocyanure d'une fonction chimique très active. Il est de plus très liposoluble. Les propriétés antiseptiques de la farine de moutarde étaient d'ailleurs connues depuis longtemps.

L'allylsènevol pourrait donc *a priori* constituer, au point de vue pratique, un excellent antiseptique qui empêcherait la fermentation acétique. A la dose de 2 mg. par litre qui constitue la limite à laquelle les ferments acétiques ne se développent plus, l'addition de ce composé altérerait les qualités organoleptiques du vin et en particulier son goût. Peut-être pourrait-on, dans ces cas, combiner l'action de SO^2 et de l'essence de moutarde.

i) *Thiosinamine ou allylsulfurée.*

Il est à remarquer que ce composé, non volatil et très peu liposoluble est extrêmement peu actif (N/250)

j) *Bromure d'allyle.*

Il en est de même de ce composé, volatil cependant, mais ne comportant aucune fonction aldéhyde ni cyanure. Son action est à peu près identique (N/250 environ).

k) *Acide borique*

Voicu et Miculescu, ajoutant des quantités d'acide borique variant de 10 à 50 mg. % dans le milieu de culture, constatèrent en 1931 une action favorisante vis-à-vis du mycoderme du vin dans des proportions souvent considérables, fonction de la vitalité des souches.

Nous n'avons pu, à ces doses, observer les mêmes résultats chez nos bactéries acétiques. Aux plus hautes doses, les auteurs précités observèrent une action toxique, action que l'addition de glucose diminuait notablement. Il est probable que dans ces cas, le milieu nutritif contenait des substances pouvant se combiner avec l'acide borique (vin blanc), ces substances étant l'acide tartrique, le glycérol, le sucre, et que cette combinaison faisait disparaître une partie de l'acide borique, ce qui diminuait sa toxicité.

TABLEAU XI

CONCENTRATIONS INHIBANT LA CROISSANCE DE B. BORDEAUX

Acide monochloracétique	N/100
— bromacétique	N/400
— iodacétique	N/200
Chloracétate de méthyle	N/200
— d'éthyle	N/200
— de propyle	N/200
— d'octyle	N/250
— de glycol	N/500
— d'éthylglycol	N/800
— de glycérol	N/500
— de benzyle	N/800
— de phénéthyle	N/800

Glycol	N /10
Ethylglycol.....	N /10
Méthylglycol	N /10
Bromacétate de méthyle	N /2.000
— d'éthyle.....	N /2.000
Bromacétate de propyle	N /2.000
— d'octyle	N /3.000
— de glycol	N /2.000
— d'éthylglycol	N /3.000
— de glycérol	N /2.500
— de benzyle	N /2.000
— de phénéthyle	N /2.000
Bromure allyle	N 250
isosulfocyanate allyle	N /50.000
— phényle	N /20.000
Thiosinamine.....	N /250
Cyanure de potassium	N /60.000
Bromure de cyanogène	N /10.000
Quinosol	N /800
Résorcine!.....	N /50
Hexylrésorcimol.....	N /5.000
Salicylate de Na.....	N /3.000
Monofornine glycol	N /30
Monochlorhydrine glycol	N /25
Aldéhyde bromocentanthyque	N /50.000
Sa combinaison bisulfitique	N /10.000

II. Généralisation à d'autres bactéries.

Action de quelques antiseptiques sur la croissance du bacille tuberculeux

L'action inhibitrice des substances médicamenteuses ou des antiseptiques sur le développement du bacille tuberculeux n'est pas aisée à mettre en évidence. En effet, ce microbe se développe lentement, et d'une façon souvent irrégulière sur les milieux artificiels même lorsqu'il est placé dans les conditions les plus favorables. Mais il suffit de choisir une souche bien adaptée par plusieurs passages pour obtenir un développement rapide. Nous nous sommes servis d'une culture du bacille tuberculeux du laboratoire de Bactériologie de l'Ecole de Santé Navale de Bordeaux qui nous a été fournie par M. le Médecin en chef Lechuiton. Cette race était accoutumée au milieu dont voici la composition :

Asparagine	4
Glycérine	60
Acide citrique.....	2
PO ⁴ K ² H	0,5
SO ⁴ Mg	0,5
Citrate de fer ammoniacal .	0,05

Au bout du quatrième ou du cinquième jour, on commençait à apercevoir le voile bactérien.

Nos recherches ont été conduites de la façon suivante : 50 cm³ du milieu ci-dessus, de pH voisin de 7,5, ont étéensemencés après addition du corps chimique étudié au moyen d'un voile de la souche en plein développement sur ce même milieu. Les ballons, bouchés et encapuchonnés, placés à l'étuve à 37° ont été examinés tous les jours.

Nous avons étudié ainsi l'action des cinq corps suivants : isosulfocyanate d'allyle, isosulfocyanate de phényle, hexyl-résorcinol, bromacétate d'éthylglycol, et bromacétate de glycérol. Certaines de ces substances, les isosulfocyanates en particulier, exigeaient une certaine quantité d'alcool pour leur dissolution. Or, l'alcool éthylique empêche la croissance du bacille tuberculeux à la concentration de 5 %. Aussi, avons-nous opéré en solution alcoolique beaucoup plus diluée.

Le tableau ci-dessous indique les concentrations inhibant la croissance du Bacille tuberculeux :

Isosulfocyanate d'allyle	N/4000 soit 0,0025 %
Isosulfocyanate de phényle	N/5000 — 0,0027 %
Hexylrésorcinol	N/4000
Bromacétate d'éthylglycol	N/3000 — 0,008 %
Bromacétate de glycérol	N/2000 — 0,015 %

Ces résultats nous ont permis de montrer que les isosulfocyanates d'allyle et de phényle agissent à des concentrations comparables à celles du cyanure double d'or et de K qui agit à la dose de 0,0006 % et à celle de l'oxycyanure de Hg (0,0020 %), ces deux corps étant les plus actifs connus.

Voici d'ailleurs l'ordre dans lequel se classent les antiseptiques vis-à-vis de la croissance du bacille tuberculeux. Nous avons intercalé dans ce tableau dû à Karwacki et Biernacki, les antiseptiques que nous avons étudiés :

Cyanure d'or et de potassium	0,0006
Oxycyanure de mercure	0,0020
Isosulfocyanate d'allyle	0,0025
Isosulfocyanate de phényle	0,0027
Thymol	0,004
Charbon colloïdal (approximativement)	0,006-0,030
Bromacétate d'éthylglycol	0,008
Sulfate de cuivre	0,010
Bromacétate de glycérol	0,015
Acide arsénieux	0,020
Bichlorure de mercure	0,04
Phénol	0,20

Mais nous ne pouvons pas, dans l'état actuel de nos connaissances, établir un parallèle entre l'action inhibitrice d'une substance et son pouvoir curateur. De plus, les concentrations limites trouvées peuvent ne pas être exactement les mêmes pour une autre race du bacille tuberculeux dont les protéines cellulaires pourraient être différentes.

Nous constatons que pour l'hexylrésorcinol et les bromacétates employés, les concentrations inhibitrices pour le bacille tuberculeux utilisé sont sensiblement les mêmes que celles qui arrêtent la croissance de nos bactéries acétiques. Les isosulfocyanates ont une action du même ordre, que les bromacétates. Ces propriétés rapprochent par conséquent les bactéries acétiques, purement aérobies, très sensibles aux agents liposolubles inhibant la respiration, du bacille tuberculeux.

B. INHIBITION DE LA RESPIRATION DE B. BORDEAUX

Nous avons vu, sur le B. Bordeaux, étudié ensuite l'influence de ces divers composés chimiques sur le métabolisme et nous avons déterminé la concentration de ces produits

qui réduisait de moitié l'activité cellulaire mesurée par l'intensité respiratoire.

Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU XII

CONCENTRATION INHIBANT LA RESPIRATION DE 50 %

Acide monochloracétique	N /10
— bromacétique	N /25
— iodacétique	N /20
Chloracétate de méthyle	N /20
— d'éthyle	N /20
— de propyle	N /20
— d'octyle	N /30
— d'éthylglycol	N /50
— de glycérol	N /50
— de benzyle	N /50
— de phénéthyle	N /50
— de glycol	N /30
Bromacétate de méthyle	N /200
— d'éthyle	N /200
— de propyle	N /200
— d'octyle	N /250
— de glycol	N /250
— d'éthylglycol	N /250
— de glycérol	N /250
— de benzyle	N /100
— de phénéthyle	N /100
Bromure d'allyle	N /100
Isosulfocyanate d'allyle	N /10.000
— de phényle	N /4.000
Thiosinamine	N /100
Cyanure de potassium	N /30.000
Bromure de cyanogène	N /5.000
Quinosol	N /75
Résorcinol	N /1.000
Hexylrésorcinol	N /1.000
Aldéhyde bromocœnanthylique (A)	N /8.000
Combinaison bisulfite de (A)	N /3.000
Aldéhyde bromopropionique	N /2.500
Acétal de l'aldéhyde B bromopropionique	N /250

Nous voyons, à l'examen de ces résultats que les corps les plus actifs sur la respiration sont encore, dans l'ordre, le cyanure de potassium, l'allylsénevol et l'aldéhyde bromocœnanthylique. Il semble donc que les fonctions actives

soient encore la fonction cyanure et la fonction aldéhyde bromée en position α .

Notons aussi une activité plus nette des bromacétates comparée à celle des chloracétates et surtout à celle des acides correspondants.

Notons que les concentrations qui inhibent de 50 % la respiration de ces bactéries sont nettement supérieures (de l'ordre de 10 fois) dans tous les cas à celles qui arrêtent leur croissance, et nous pouvons dire que l'arrêt du développement microbien est déjà complet lorsque l'inhibition de la respiration n'est encore qu'à peine sensible, ou qu'elle est pratiquement nulle. Ceci prouve qu'il est possible, à l'aide de ces antiseptiques, d'arrêter leur développement bactérien sans que toutes les fonctions cellulaires soient détruites.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons :

1° Isolé une bactérie acétique dont nous avons donné les caractères morphologiques et cultureux ainsi que les propriétés biologiques qui ont permis de la différencier de celles déjà connues.

2° Etudié ensuite et discuté les divers mécanismes d'oxydation de l'alcool par les bactéries acétiques; étudié la respiration et la vie à l'abri de l'air de notre bactérie; précisé qu'elle n'attaque aucun sucre.

3° Envisagé l'action inhibitrice d'un certain nombre de composés chimiques sur sa croissance et sur sa respiration.

4° Cherché à étendre à d'autres bactéries aérobies les résultats obtenus.

Si ce modeste travail a pu apporter, dans ce cas particulier, quelque contribution à l'étude du mécanisme intime des réactions cellulaires, il aura atteint son but.

BIBLIOGRAPHIE

- Aubel et Genevois.** — *Etat actuel de la question des ferments*, Gauthier-Villars, Paris, 1929.
- Bass and Johnson.** — *Journ. of Amer. chem. Soc.*, 52, 1146, 1930.
- Bechhold (H.) and Ehrlich (P.).** — *Z. physiol. chem.*, 47, 173, 1906.
- Bertho (Alfred).** — *Zur Kenntniss des Essigferments Lieb. Ann.*, 474, 1, 1919.
- Bertho (A.) et Basu (K. P.).** — *Die Bedeutung der Aldehyd Dismutation für die Essiggärung, ibidem*, 485, 26, 1931.
— *Die Essiggärung (Ergebnisse der Enzymforschung)*.
— *Band 1 Akademische Verlagsgesellschaft*, Leipzig, 1932.
- Bertrand (G.) et Sazerac (R.).** — Sur une différenciation biochimique des deux principaux ferments du vinaigre, *C. R. Ac. Sc.*, 132, 1504, 1901.
— Activation de la fermentation acétique par les sels de Mn., *C. R. Ac. Sc.*, 157, 149, 1913.
- Bettylee Hampil.** — *Journ. Infection diseases*, 43, 25, 1928.
- Bokorny (Th.).** — *Centralblatt f. bakt.*, 2^e partie, 12, 484, 1904.
- Bolcato.** — « Azione dell'acido acetico e dell'acido lattico sulla fermentazione lattico-acetica », *Boll. Ist. Serotherap. milanese*, Milano, 9, 689, décembre 1930.
- Boutroux.** — « Sur la fermentation acide du glucose », *C. R. Ac. Sc.* 102, 924, 1886.
— « Sur l'oxydation du glucose par les microbes », *Ann. Inst. Pasteur*, 309, 1888.
- Cayrol (P.).** — « Action des dérivés halogénés sur la fermentation alcoolique », *C. R. Ac. Sc.*, 193, 446, 1931.
— *Recherche sur l'action des dérivés halogénés et de leurs esters, sur les cellules de levure*, thèse de Bordeaux, 1934 et *Ann. de physiologie et physico-chimie biologique*, 10, 1934.
- Cayrol et Genevois.** — « Inhibition spécifique de la fermentation alcoolique des cellules de levure sans arrêt ni de la respiration,

- ni de la réaction de Pasteur-Meyerhof, ni de la croissance », *C. R. Ac. Sc.*, 192, 1494, 1931.
- Coppin** (C. A.). — « Quickvinegar production », *Trop. Agric. (Trinidad)*, 140, 144, 1932.
- Courmont, Gardère et Pichat**. — « Limite de l'action des sels d'or sur les cultures homogènes du bacille de Koch », *C. R. Soc. Biol. Paris*, 111, 387, 1932.
- Cozie** (Marguerite). — « Inhibition de la croissance et de la respiration de *Bacterium xylinum* par les dérivés halogénés », *C. R. Soc. Biol.*, 112, 1387, 1933 et *Ann. Brass. et Distill.*, 31, 131, 1933.
- « Oxydations et réductions déterminées par *Acétolacter xylinum* », *C. R. Ac. Sc.*, 196, 1740, 1933.
- Emerson**. — « The effect of certain respiratory inhibitors on the respiration of chlorella », *Journ. gen. Physiol.*, 10, 469, 77, 1927.
- Fromageot** (Cl.). — « Contribution à l'étude physicochimique du métabolisme », *Journal de Chimie-Physique*, 24, 513-623, 1927.
- Garofeanu**. — « Action bactéricide du salicylate de Na », *C. R. Soc. Biol.*, 104, 513, 1930.
- Genevois** (L.). — *Métabolisme et fonction des cellules*, Paris, Masson, 1931.
- « Sur l'inhibition de la fermentation alcoolique par divers dérivés bromés ou non », *P. V. Soc. Sc. Phys. Bordeaux*, 7, 12, 1931.
- Genevois, Cayrol et Nicolaieff**. — « Action des dérivés halogénés sur les cellules des champignons inférieurs (levures et moisissures) », *C. R. Soc. Biol.*, 112, 1382, 1933.
- Genevois et Kirrmann**. — « Action des aldéhydes des cétones halogénés sur les cellules de levure », *C. R. Soc. Biol.*, 92, 1383, 1933.
- Genevois et Nicolaieff**. — « Inhibition de la fermentation lactique bactérienne par les acides aliphatiques halogénés en α », *C. R. Ac. Sc.*, 194, 1270, 1932.
- « Action des dérivés halogénés sur la fermentation lactique bactérienne », *C. R. Soc. Biol.*, 92, 1385, 1933.
- Gorr et Perlmann**. — *Bioch. Z.*, 174, 433, 9, 1926.
- Gorr et Ueber** (G.). — *Acetessigsäure bildung durch Leberbräi* *Biochem. Zeitschr.*, Berlin, 254, 8, 1932.
- Hampil**. — (Voir Bettylee.)

- Henneberg.** — *Handb. der gärungsbakteriologie*, Berlin, 1929.
- Hermann et Neuschul.** — *Biochem. Z.*, 233, 129, 1931.
— *Ibidem*, 255, 446, 1932.
- Hidan** (T. T.). — « Physiologie der essiggarung », *Acta Phytochimica*, 5, 119, 1930.
- Hodge et Johnson.** — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 35, 1014, 1913.
- Janke** (A.j. — *Centralblat f. Bakteriöl II abt.*, 53, 81, 124, 1921.
- Janke** (A.) und **Kropaczý** (S.). — *Biochem. Z.*, 278, 37, 1930.
- Johnson.** — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 51, 1526, 1929.
- Keilin.** — *Proc. of Roy. Soc. Biol.*, 98, 312, 1925; *id.*, 100, 129, 1926;
id., 104, 206, 1929.
- Klarmann** (Emil). — *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 48, 791 et 2538, 1926.
- Kitasato** (T.). — *Biochem. Z.*, 195, 118, 1928.
- Kling** (A.). — « Oxydation du propylglycol par le *mycoderma aceti* », *C. R. Ac. Sc.*, 133, 231, 1901.
- Kluyver** (A. S.). — « The chemical activities of microorganisms », *University of London press*, 1931.
- Krehan.** — *Arch. Mikrobiöl*, 3, 277, 1932.
- Krontowski Jazimirska** (A. M.). — « Action de l'acide monobromacétique et de l'acide monoiodacétique sur le métabolisme des cellules et la croissance *in vitro* et *in vivo* des tissus normaux et des tumeurs », *C. R. Soc. Biol.*, 109, 640, 1932.
- Kuhn** (R.). — *Naturw.*, 2, 732, 1923.
- Lafar.** — *Hand. der technischen Mykologie insbesondere*, 4 und 5, Jena, 1907-1914.
- Lane and Johnson.** — *Journ. of Amer. Chim. Soc.*, 43, 348, 1921.
- Laubenheimer** (K.). — *Phenol und seine derivate als desinfektion mittel*, Berlin, Wien, 1909.
- Lwoff** (A.). — « La fonction du sang dans les cultures des trypanosomides », *C. R. Soc. Biol.*, 113, 231, 1933.
— « Die bedeutung des blutfarbstoffes die parasiteschen flagellaten », *Zentralbl. Bakteriöl.*, 130, 498, 1934.
- Mayer** (P.). — *Biochem. Z.*, 174, 420, 1926.
- Meyerhof.** — *Chimie de la contraction musculaire*. Traduit et annoté par L. Genevois (Delmas, Bordeaux), Hermann et Cie, Paris, 1932.
- Moreau** (L.) et **Vinet** (E.). — « Valeur antiseptique de l'allylsénevol en vinification », *A. F.*, 17, 477, 1924.

Muller (D.). — *Biochem. Zeit.*, 254, 97, 1932.

— *Untersuchungen über oxydasen in Ygetölee Essigbakterien*, 238, 253, 1931.

Myrbäck **Euler**, **Sandberg** (H.). — 175, 316, 1928.

Neuberg (C.) et **Molinari** (E.). — « Über den Verlauf der Essiggärung », *Naturw.*, 14, 758, 1926; *Biochem. Z.*, 166, 454, 1925.

Neuberg (C.) et **Nord**. — *Biochem. Z.*, 96, 168, 1919.

Neuberg (C.) et **Rosenthal**. — *Ber.*, 57, 1436, 1924.

Neuberg (C.) et **Simon** (E.). — *Biochem. Zeit.*, 197, 259, 1928; *ibid.*, 253, 225, 1932.

Neuberg (C.) et **Windisch**. — « Über die Essiggärung und die chemischen Leistungen der Essigbakterien », *Biochem. Z.*, 166, 454, 1925.

Pasteur (L.). — « Rôle des mycodermes dans la fermentation acétique », *C. R. Ac. Sc.*, 54, 265, 270, 1862; 55, 28-32, 1862.

— *Bull. Soc. Chim. Paris*, 52-53, 9 mai 1862; *Ann. Scient. de l'Ecole Normale Sup.*, 113, 158, 1^{er} avril 1864.

Quastel (Juda Hirsch). — « L'étude des bactéries non proliférantes », *Bull. Soc. Biol.*, 10, 1282, 1928.

— « Quelques travaux récents sur les actions chimiques des bactéries, leur relation avec les problèmes de fermentation », *Ann. Brass. et Dist.*, 10, 12, 1928.

— « Bactériel metabolism. (Ergebnisse der Enzymforschung I band) », *Akademische Verlagsgesellschaft*, Leipzig, 1932.

Quéré (H.). — « L'oxydation des alcools par les ferments acétiques considérée comme une forme de la respiration cellulaire », *C. R. Ac. Sc.*, 192, 1494, 1931; 193, 444, 1931.

— « Inhibition de la croissance et du métabolisme chez les ferments acétiques », *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 110, 958, séance 8 juin 1932.

— « Inhibition du ferment acétique par divers dérivés halogénés », *C. R. Soc. Biol.*, 112, 1398, 1933.

Reddish. — *Ann. Journ. Public. Health*, 320, 1927.

Reid (Albert). — « Manometric measurement of respiration », *Bioch. Zeitschr.*, 242, 159-69, 1931.

Robinovitch Steler. — « A chemical basis for the treatment of tuberculosis », *Amer. Rev. Tuberc. Baltimore*, 9, 4587, 1924-1925.

Rosenthal (G.). — « Le tricyanure d'or agent d'inhibition du développement du bacille tuberculeux », *Bull. général de Thérap.*, Paris, 1913, 165, 804.

- Sazerac** (R.). — « Sur une bactérie oxydante, son action sur l'alcool et la glycérine », *C. R. Ac. Sc.*, 137, 90, 1903.
- Schaffer** (J. M.) and **Tilley Fiv.** — *Journ. Bacteriology*, 12, 303, 1926.
- Shibata** (E.) et **Tamiya** (V.). — *Acta phytochimica*, 5, 23, 1930.
- Siefert** (W.). — *Oesterreichische chemiker Zeitung*, 1, 381, 1898.
- Simon** (E.). — « Über das zymatische system und die Wirkung der Essigbakterien », *Biol. Z.*, 224, 235, 1930.
— *Bioch. Z.*, 245, 488, 1932; *Zentr. Bak. Parasitenk II Abt.*, 88, 269, 1932.
- Smith.** — *Journ. of Hyg.*, 19, 1920.
- Szepesi** (K.). — *Des verhalten des Tuberkelbacillus gegenüber der impregnation mit silbersalzen* (*Bectre Z. Klin. de tuberk.*), Berlin, 1924-1925, 60, 484.
- Tarahashi** (Teizo) et **Asai** (Toshinobu). — « Bacterium industrium acetobacter », *J. Agr. Chem. Soc. Japon*, 7, 1, 5, 1931.
- Tamiya** (H.) et **Tanaka** (K.). — « Zur Physiologie der essigsäuregarung », *Acta Phytochimica*, 5, 167, 1931.
- Tanaka** (K.). — « Zur Physiologie der Essigsäuregärung », *Acta Phytochimica*, 5, 239, 266, 1931.
- Tassinari.** — *Gazz. Chim. Ital.*, 17, 83, 1997; 19, 343, 1889; 20, 362, 1890.
- Tora Kitasato.** — *Biochem. Z.*, 195, 118, 1928.
- Virtanen** (A. J.) et **Karstrom** (H.). — *Biochem. Z.*, 161, 9, 1925.
- Voicu** (I.) et **Miculescu** (M.). — « Influence de l'acide borique sur les cultures de Mycodermes et son rôle dans la production de la fleur sur les vins », *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 13, 150, 1931.
- Warburg** (O.). — *Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs*, traduction Aubel et Genevois, Paris, Alcan, 1928.
- Wieland** (H.) et **Bertho** (A.). — « Über den mechanismus der oxydations vorgänge », *Lieb. Ann.*, 467, 95, 1928.
- Willstaetter, Graser, Kuhn.** — *Z. Physiol. Ch.*, 123, 1, 1922.
- Wowern** (Ivon) et **Klarmann** (E.). — *Journ. of Amer. Chim. Soc.*, 51, 605, 1929.
- Wuyts.** — *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 26, 304, 1912.
- Warburg** et **Christian.** — « Ueber das gelbe oxydation ferment », *Biochem. Z.*, 257, 492, 1933; 258, 496, 1933; 263, 228, 1933.
- Warburg** et **Negelein** (E.). — « Ueber das absorptions spektrum des atmungsferments », *Biochem. Z.*, 202, 202, 1928; 214, 101, 1929.

— « Spektroskopischer Nachweis des sauerstoffübertragenden
ferments neben cytochrom », *Biochem. Z.*, 266, 1, 1933.

Yamasaki. — « Ueber die Wirkung der mono iodessigsäure auf
Teilfermente der Zymase », *Biochem. Z.*, 228, 123, 1930.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE :

L'Hydrogène lourd; l'eau lourde

Vu :
Le Président
DAURE.

Vu,
Le Doyen,
J. CHAINE.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 23 octobre 1935.
Le Recteur de l'Académie,
A. TERRACHER.

